

Abschlussbericht Teilprojekt 10.1.1

Projekttitlel: Genetische Wirtsfaktoren bei Virushepatitis

Projektleiter: Prof. Dr. med. W. Siffert
Universitätsklinikum Essen
Institut für Pharmakologie
Hufelandstr. 55
45122 Essen

Telefon: +49(0) 201 / 723 3470

Fax: +49(0) 201 / 723 5968

E-Mail: winfried.siffert@uni-essen.de

Berichtszeitraum: 01.02.2002 – 31.01.2005

1. Aufgabenstellung

Ziel des Projekts ist die Identifizierung genetischer Wirtsfaktoren, die das Risiko für eine Infektion mit HCV/HBV erhöhen, den Verlauf der Erkrankung mitbestimmen (Fibrose, Zirrhose, Leberzellkarzinom), bzw. die prädiktiv für ein Therapieansprechen oder Therapieversagen sind. Hierzu werden sog. „single nucleotide polymorphisms (SNPs)“ untersucht. Darunter versteht man Nukleotidaustausche in Genen, die das Genprodukt (Protein) verändern (z.B. Aminosäureaustausche, Spleißvarianten), die Stabilität der mRNA beeinflussen, z.B. bei Polymorphismen im 3'-nicht-translatierten Bereich der DNA, oder die das Expressionsniveau verändern, z.B. durch SNPs in Promotoren, die die Bindung von Transkriptionsfaktoren und damit die Promotoraktivität beeinflussen. Letztendlich ist es das Ziel solcher Untersuchungen, die Therapie bei Virushepatitiden durch geeignete Gentests zu individualisieren. Beispielsweise ist es unbekannt, warum manche Patienten das Hepatitis –C-Virus spontan eliminieren können. Ebenfalls unbekannt ist, welche Patienten, die mit HCV-1 –Virus infiziert sind, auf eine Therapie mit Interferon/Ribavirin besonders ansprechen. Hier ergibt sich die Chance, nach entsprechenden Genanalysen z.B. Dosierung und Therapiedauer individuell anzupassen, um die Heilungsraten spezifisch zu erhöhen.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Ursprünglich war es geplant, dass die Untersuchungen an Patienten durchgeführt werden, deren DNA –Proben in der zentralen DNA- und Serumbank eingelagert werden. Die Etablierung dieser DNA-Bank hat sich aus mehreren Gründen bis in das Jahr 2004 verzögert, wobei vorwiegend Datenschutzgründe ausschlaggebend waren. Insofern konnte auf dieses Repositorium nicht zurückgegriffen werden. Stattdessen wurde eine enge Kooperation mit den Arbeitsgruppen von PD Dr. Berg (Berlin) und Prof. Dr. Zeuzem / Dr. Sarrazin (Homburg) initiiert, die aus klinischen Studien entsprechende DNA-Proben inklusive Phänotypisierung gelagert hatten. Erschwerend für das Vorhaben war vor allem die personelle Unterbesetzung. Zwar konnte aus den bewilligten Geldern eine MTA für Laborarbeiten beschäftigt werden, es fehlte jedoch die Stelle eines Wissenschaftlers zur Anleitung der MTA, Auswertung der Ergebnisse, Verfassen von Publikationen etc. Diese Arbeiten

mussten daher vom Projektleiter, der daneben eine Vielzahl anderer Projekte leitet und an der Essener Medizinischen Fakultät das Amt des Prodekans für Forschung innehat, alle selbst verrichtet werden.

3. Planung und Aufbau des Vorhabens

Eine reine Replizierung der Daten anderer Arbeitsgruppen konnte nicht Ziel des Vorhabens sein. Insofern wurde die Strategie verfolgt, Assoziationsstudien mit selbst detektierten Polymorphismen durchzuführen, z.B. dem GNB3 C825T – Polymorphismus. Daneben wurden Maßnahmen getroffen, um in weiteren Genen der Signaltransduktion relevante SNPs zu detektieren und zu validieren. Somit erfolgte einerseits die Genotypisierung der von den Gruppen Berg/Zeuzem/Sarrazin zur Verfügung gestellten DNA-Proben und gleichzeitig begannen systematische Sequenzierungsarbeiten am Gen GNAQ, das für die Gαq-Untereinheit heterotrimerer G-Proteine kodiert.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Die SNP-Detektion erfolgte mittels Pyrosequencing, einem Hochdurchsatz-typisierungsverfahren auf dem höchsten Stand der Technik. In diesem Verfahren erfolgt die Sequenzbestimmung nach der Methode „Sequenzierung durch Synthese“.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Wie oben erwähnt erfolgte eine enge Kooperation mit den Arbeitsgruppen PD Dr. Berg (Berlin) und Dr. Sarrazin/ Prof. Zeuzem (Homburg/Saar).

6. Erzielte Ergebnisse

Es wurden insgesamt 408 DNA-Proben HCV- infizierter Patienten bezüglich des GNB3 C825T-Polymorphismus und daran koppelnder Polymorphismen analysiert. Hierbei handelte es sich sämtlich um DNA-Proben von Patienten, die an standardisierten klinischen Studien teilgenommen hatten, bei denen jedoch unterschiedliche Therapien zur Anwendung kamen. Einige Patienten erhielten eine Monotherapie mit Interferon, andere eine Kombinationstherapie mit Standardinterferon/Ribavirin ± Amantadin, wiederum andere Patienten wurden mit PegInterferon therapiert. Da eine pharmakogenetisch sinnvolle Auswertung nur unter gleichen Therapiebedingungen erfolgen kann, kamen letztendlich 232

Patienten zur Auswertung, von denen 154 mit HCV-1, und 78 mit HCV non-1 infiziert waren. Zielgrößen der Auswertung war Nichtansprechen auf Therapie (Non-Responder NR) und „Sustained virological response“ (SVR). Eine detaillierte Beschreibung des Kollektivs ist in der folgenden Tabelle gegeben.

Tabelle 1: Patientencharakteristik und “non-responder” versus “sustained responder” status nach *GNB3* Genotyp

Variable	All	<i>GNB3</i>			<i>P</i>
		CC	CT	TT	
N (%)	232	102 (44.0)	101 (43.5)	29 (12.5)	
Alter,	48.6 ± 10.4	48.2 ± 10.0	48.1 ± 11.0	52.0 ± 9.7	0.17
Geschlecht, männlich (n,	147 (63.4)	61 (41.5)	64 (43.5)	22 (15.0)	0.28
Infektionsweg (n, %)					
i.v.Drogen	61	32 (52.5)	24 (39.3)	5 (8.2)	
Blutprodukte	57	22 (38.6)	27 (47.4)	8 (14.0)	
Andere	114	48 (42.1)	50 (43.8)	16 (14.0)	
Viruslast x 10 ⁶	3.1 ± 5.0	2.7 ± 4.7	3.2 ± 5.0	4.0 ± 6.1	0.57
AST (GOT)	37.8 ± 31.2	35.4 ± 27.7	40.9 ± 42.9	35.8 ±	0.54
ALT (GPT)	67.4 ± 56.0	61.9 ± 52.6	73.6 ± 62.4	64.9 ±	0.31
Infektionsdauer, y	15.8 ± 8.5	16.9 ± 8.1	14.9 ± 8.6	14.3 ± 9.4	0.24
HCV Genotyp 1 (n, %)	154 (66.4)	70 (45.5)	67 (43.5)	17 (11.0)	
HCV Genotyp non-1 (n, %)	78 (33.6)	32 (41.0)	34 (43.6)	12 (15.4)	0.60
Therapieantwort (n, %)					
NR	106 (45.7)	54 (50.9)	44 (41.5)	8 (7.5)	
SVR	126 (54.3)	48 (38.1)	57 (45.2)	21 (16.7)	0.01

Es ist deutlich erkennbar, dass die demografischen Parameter (Alter, Geschlecht, Dauer der Infektion), Infektionsroute, Viruslast zu Beginn der Therapie etc. nicht mit dem *GNB3*-Genotyp assoziiert sind. Hingegen findet sich eine signifikante Anreicherung des CC-Genotyps bei NR im Vergleich zu SVR.

Diese Daten werden in der nächsten Tabelle weiter nach dem HCV-Genotyp aufgeschlüsselt. Bekanntlich ist der Therapieerfolg bei HCV non-1 – Infektion wesentlich besser (ca. 85 %), während bei HCV-1-Genotyp geringere Ansprechraten

im Bereich von 50 – 60 % erwartet werden können.

Tabelle 2: Therapieantwort in Abhängigkeit vom HCV und *GNB3* Genotyp

		<i>GNB3</i>			<i>P</i>
		CC	CT	TT	
<u>HCV Genotyp 1</u>					
NR	99	54 (51.5)	42 (42.4)	6 (6.1)	
SVR	55	19 (34.5)	25 (45.5)	11 (20.0)	0.004
<u>HCV Genotyp non-1</u>					
NR	7	3 (42.9)	2 (28.6)	2 (28.6)	
SVR	71	29 (40.8)	32 (45.1)	10 (14.1)	0.666

Es wird ersichtlich, dass der Genotypeneffekt auf die Therapieantwort nur bei HCV-1-infizierten Patienten sichtbar ist, nicht jedoch bei HCV non-1 infizierten Patienten.

In der logistischen Regressionsanalyse (NR versus SVR) erkennt man, dass neben dem HCV-Genotyp nur der *GNB3* CC-Genotyp ein unabhängiger Prädiktor für Nichtansprechen auf Therapie ist.

Tabelle 3: Logistische Regressionsanalyse des Effekts unterschiedlicher Variablen auf den NR-Status bei Patienten mit HCV-Infektion

Multivariables Modell		OR (95% CI)	P
HCV Genotyp			
	non-1	1*	
	1	17.2 (7.04 – 72.04)	<0.001
Viruslast		1.00 (1.00 - 1.00)	0.721
Geschlecht			
	w	1*	
	m	1.31 (0.67 - 2.56)	0.430
Alter		1.02 (0.99 – 1.01)	0.132
GNB3 Genotyp			
	TT	1*	
	CT	2.07 (0.70 - 6.14)	0.191
	CC	3.01 (1.01 – 9.28)	0.044

In einer weiteren Analyse wurden nur HCV-1-infizierte Patienten untersucht.

Tabelle 4: Logistische Regressionsanalyse des Effekts unterschiedlicher Variablen auf den NR-Status bei Patienten mit HCV-1- Infektion

Multivariates Modell		OR (95% CI)	P
Viruslast		1.00 (1.00-1.00)	0.753
Geschlecht			
	W	1*	
	M	1.27 (0.61-2.65)	0.521
Alter		1.03 (0.99 – 1.06)	0.127
GNB3 Genotyp			0.038
	TT	1*	
	CT	3.19 (0.96 – 10.64)	0.058
	CC	4.86 (1.43 – 16.50)	0.011

Für CC-Genotypen besteht damit ein signifikantes Risiko, zur Gruppe der NR zu gehören.

Die Response-Raten stellen sich damit wie folgt dar: CC-Genotyp – 26 %; TC-Genotyp – 37 %, TT- Genotyp 64 %.

Mit dieser Untersuchung gelingt damit zum ersten Mal der Nachweis, dass ein Polymorphismus in einem Gen, dessen Genprodukt maßgeblich an der

intrazellulären Signaltransduktion beteiligt ist, die Therapieantwort bei HCV-Infektion signifikant beeinflussen kann.

7. Nutzen / Verwertbarkeit

Die Ergebnisse sind vorwiegend von wissenschaftlichem Interesse. Der heutige Goldstandard bei HCV-Infektion ist die Therapie mit pegyliertem Interferon / Ribavirin, und dazu liegen bezogen auf den untersuchten GNB3-Polymorphismus noch keine Daten vor.

8. Während der Laufzeit des Vorhabens bekannt gewordene Fortschritte bei anderen Stellen

Es sind eine Reihe von Publikationen zu anderen Genen und zur Therapieantwort bzw. Progression einer Virushepatitis bekannt geworden, die sich aber nicht auf G-Proteinpolymorphismen beziehen.

Literatur:

P. K. Constantini, M. Wawrzynowicz-Syczewska, M. Clare, A. Boron-Kaczmarek, I. G. McFarlane, M. E. Cramp, and P. T. Donaldson. Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. *Liver* 22 (5):404-412, 2002.

Y. Sugimoto, N. Kuzushita, T. Takehara, T. Kanto, T. Tatsumi, T. Miyagi, M. Jinushi, K. Ohkawa, M. Horimoto, A. Kasahara, M. Hori, Y. Sasaki, and N. Hayashi. A single nucleotide polymorphism of the low molecular mass polypeptide 7 gene influences the interferon response in patients with chronic hepatitis C. *J. Viral Hepat.* 9 (5):377-384, 2002.

S. Barrett, M. Collins, C. Kenny, E. Ryan, C. O. Keane, and J. Crowe. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta,

interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *J.Med.Virol.* 71 (2):212-218, 2003.

S. Hellier, A. J. Frodsham, B. J. Hennig, P. Klenerman, S. Knapp, P. Ramaley, J. Satsangi, M. Wright, L. Zhang, H. C. Thomas, M. Thursz, and A. V. Hill. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology* 38 (6):1468-1476, 2003.

S. Knapp, B. J. Hennig, A. J. Frodsham, L. Zhang, S. Hellier, M. Wright, R. Goldin, A. V. Hill, H. C. Thomas, and M. R. Thursz. Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. *Immunogenetics* 55 (6):362-369, 2003.

S. Knapp, L. J. Yee, A. J. Frodsham, B. J. Hennig, S. Hellier, L. Zhang, M. Wright, M. Chiaramonte, M. Graves, H. C. Thomas, A. V. Hill, and M. R. Thursz. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. *Genes Immun.* 4 (6):411-419, 2003.

T. Mueller, R. Gessner, C. Sarrazin, C. Graf, J. Halangk, H. Witt, E. Kottgen, B. Wiedenmann, and T. Berg. Apolipoprotein E4 allele is associated with poor treatment response in hepatitis C virus (HCV) genotype 1. *Hepatology* 38 (6):1592-1593, 2003.

M. Wright, R. Goldin, S. Hellier, S. Knapp, A. Frodsham, B. Hennig, A. Hill, R. Apple, S. Cheng, H. Thomas, and M. Thursz. Factor V Leiden polymorphism and the rate of fibrosis development in chronic hepatitis C virus infection. *Gut* 52 (8):1206-1210, 2003.

L. J. Yee, K. A. Perez, J. Tang, D. J. van Leeuwen, and R. A. Kaslow. Association of CTLA4 polymorphisms with sustained response to interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C virus infection. *J.Infect.Dis.* 187 (8):1264-1271, 2003.

T. Mueller, A. Mas-Marques, C. Sarrazin, M. Wiese, J. Halangk, H. Witt, G. Ahlenstiel, U. Spengler, U. Goebel, B. Wiedenmann, E. Schreier, and T. Berg. Influence of interleukin 12B (IL12B) polymorphisms on spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *J.Hepatol.* 41 (4):652-658, 2004.

F. Suzuki, Y. Arase, Y. Suzuki, A. Tsubota, N. Akuta, T. Hosaka, T. Someya, M. Kobayashi, S. Saitoh, K. Ikeda, M. Kobayashi, M. Matsuda, K. Takagi, J. Satoh, and H. Kumada. Single nucleotide polymorphism of the MxA gene promoter influences the response to interferon monotherapy in patients with hepatitis C viral infection. *J. Viral Hepat.* 11 (3):271-276, 2004.

H. E. Wasmuth, A. Werth, T. Mueller, T. Berg, C. G. Dietrich, A. Geier, C. Garton, J. Lorenzen, S. Matern, and F. Lammert. Haplotype-tagging RANTES gene variants influence response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 40 (2):327-334, 2004.

9. Veröffentlichung

Ein Manuskript wurde bei „Journal of Hepatology“ zur Publikation eingereicht und befindet sich derzeit im Reviewprozess:

Christoph Sarrazina,f, Thomas Bergb,f, Viola Weichb, Tobias Muellerb, Ulrich H. Freyc, Stefan Zeuzem,a, Guido Gerken,d , Michael Roggendorf,e and Winfried Siffert,c

GNB3 C825T polymorphism and response to interferon-alfa /ribavirin treatment in patients with hepatitis C virus genotype 1 (HCV-1) infection